

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Mikroorganizmusok életfolyamatának molekuláris analízise

***A Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő sejtjeiben lejátszódó oxidatív stresszfolyamatok vizsgálata**

Ph.D. értekezés tézisei

Stromájer-Rác Tímea

Témavezető:

Prof. Dr. Pesti Miklós

Egyetemi tanár

PÉCS, 2013

Bevezetés

Minden élőlényt számtalan stresszhatás ér a külvilág felől, és a belső, intracelluláris térből is. **Külső stresszhatás** lehet az ozmotikus stressz, a hőstressz, éhezés okozta stressz, toxikus anyagok által kiváltott stressz, a DNS károsító hatások okozta stressz és az oxidatív stressz. Az aerob organizmusok életfolyamataik során is termelnek reaktív oxigén fajtákat (ROS). Az élő szervezetek egyensúlyi állapotra -homeosztázis- törekednek, a ROS káros hatásait az antioxidáns védelmi rendszerek próbálják a lehető legnagyobb hatékonysággal kiküszöbölni. A védelmi rendszer legfontosabb elemei az antioxidánsok, az antioxidáns enzimek és a fémkötő peptidek.

Egyes fémek létfontosságú szerepet töltenek be néhány biológiai folyamatban (esszenciális fém), általában, mint enzimalkotók. Más fémek viszont az élőlények számára toxikusnak minősülnek. Akár esszenciális vagy nem egy fém, ha egy adott koncentráción felül van jelen a környezetben, akkor az már egyértelműen mérgező hatással bír az élőlényre. Az egyik legtoxikusabb a króm, amelynek vegyületei közül a legelterjedtebbek a +2 és +6 oxidációs számmal rendelkezők. A kromát anion (Cr(VI)) nagyon gyorsan redukálódik Cr(III) -má a sejtben, miközben szabadgyökök pl. glutationil gyök (GS^\cdot) illetve a reoxidációjuk folyamán hidroxilgyökök keletkeznek. Az így keletkezett termékek károsan befolyásolják a sejtek normális működését, neuro- és genotoxikusak, valamint karcinogén hatásúak.

Az élő szervezetek különböző mértékben képesek felvenni a krómvegyületeket és a kromátionok különböző hatást gyakorolnak rájuk. Kimutattak olyan növényi vagy mikrobiális variánsokat, amelyek a magas nehézfém koncentráció ellenére is képesek voltak életben maradni. Ez a tény akár előrevetíthetné a fémszennyezés elleni védelmet, amennyiben pontos ismeretekkel rendelkeznenk a fém-szenzitivitás és -tolerancia öröklődése területén és ismernénk pontosan a fémszennyezés által kiváltott stressz hatásait és a válaszreakciókat.

A króm és más nehézfémek hatása az élő sejtekre, és az általuk előidézett stresszfolyamatok tanulmányozása napjainkban is aktuális, ugyanis számos folyamat még nem ismert. A krómvegyületek, mint külső stresszorok hatására működésbe lépő antioxidáns rendszer nagyon összetett (enzimek, katalizátorok, transzkripciós faktorok). A krómvegyületek hatásmechanizmusának vizsgálatához, a stresszfolyamatok tanulmányozásához hozzájárul a króm-toleranciáért és króm-szenzitivitásért felelős gének vizsgálata.

Az előzőekben felvázolt nehézfém okozta külső stresszhatás mellett **belső stresszhatást** válthatnak ki mutációk és vírusfehérjék. A különböző fertőző ágensek által kódolt fehérjék szintén oxidatív stresszt okozhatnak a sejtekben. Az AIDS tünetegyüttes kialakulását a HIV-1 és a HIV-2 okozza. Napjainkban ez közel 50 millió embert érint a világon, de ez a szám napról napra rohamosan növekszik.

A HIV elsősorban a $CD4^+$ T-limfocitákat károsítja vagy közvetlenül, vagy úgy, hogy a provírus beépül a limfocita DNS-be és lappang, amíg valamilyen stimuláló hatásra el nem kezdődik a vírusok termelődése. A fertőzést követően bekövetkezik egy viszonylag hosszú lappangási időszak. Ennek az a fő oka, hogy a $CD4^+$ T-limfociták száma folyamatosan csökken, míg végül elér egy kritikus értéket, és az immunrendszer nem tudja meggátolni a különféle kórokozók által előidézett fertőzési folyamatokat. Emiatt a szervezetben számos betegség kialakulhat: opportunista fertőzések, tumorok, direkt károsodás és a szisztémás megbetegedések idegrendszeri komplikációi.

A kutatások jelentős része arra irányul, hogyan lehetne megakadályozni a vírusfertőzést, illetve megelőzni a betegség kialakulását. Az utóbbi években a kutatás középpontjába került egy fehérje, a vírus protein **R (Vpr)**, amely a HIV-1, a HIV-2 és a SIV vírusokban is megtalálható a virionokhoz kötve, és szerepet játszik a vírusfertőzés lefolyásában. A Vpr fehérje szerepe még nem tisztázott, de bizonyítottan több folyamatért felelős a fertőzés során: megállítja G2/M fázisban a sejtek osztódását a szaporodás során, felelős a sejtmag membrán széttöréséért, és végül apoptózist okoz.

Mind a króm és mind a Vpr fehérje által okozott stresszhatást egy modellszervezeten keresztül vizsgáltuk. A *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) egysejtű hasadó élesztő gomba, melynek génjei közül jó néhány nagyfokú hasonlóságot mutat magasabb rendű eukarióta szervezetek génjeivel. Heterotallikus törzsei lehetővé teszik a klasszikus genetikai vizsgálatokat (tetrádanalízis). Megtörtént a faj a teljes genom szekvenciájának meghatározása, elkészült a faj deléciós mutánsbankja, számos transformációs vektor áll rendelkezésre a molekuláris vizsgálatokhoz. Haploid kromoszóma állománya miatt a génjeiben bekövetkezett változások fenotipikusan is megmutatkoznak, ezért alkalmas a genetikai elemzésekre. Sejtciklusának menete és a stresszválaszai is nagyban hasonlóak a többsejtű eukarióta szervezetekéhez, ezért használjuk kísérleteinkben modellszervezetként.

Célkitűzés

A Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszékének egyik fő tudományos területe az oxidatív stressz kutatása. A különböző ágensek hatásmechanizmusának, oxidatív stresszt okozó tulajdonságának vizsgálata az eukarióta egysejtű hasadóélesztő, a *Schizosaccharomyces pombe* sejteiben történik.

Az egyik kiemelt terület a krómvegyületek hatásmechanizmusának, oxidatív stresszt okozó tulajdonságának vizsgálata eukarióta sejtekre, illetve a króm-szenzitivitásért és króm-toleranciáért felelős gén/gének funkcionális jellemzése volt. Munkánk során, a tanszéken mutagén kezelést követően izolált *S. pombe* króm szenzitív és toleráns törzsekkel dolgoztunk (Czakó és mtsi. 1999). A kiválasztott mutáns törzsek esetében első lépésként ki kellett választanunk azon mutánsokat, amelyekben a megváltozott krómmérzékenység egy génes mutáció eredményeként jött létre.

Feltételezéseink szerint a különböző vírus eredetű fehérjék belső stresszorként működhetnek/működnek. HIV-1 fertőzés során a vérplazmában és a cerebrospinális folyadékban is alacsonyabb GSH szint mérhető a normálisnál, ami a megváltozott oxidoredukciós rendszer következménye lehet, így a kutatások a HIV-1 fehérjéire irányultak. Tanszékünk rendelkezik olyan *S. pombe* törzsekkel, melyekben a vad típusú Vpr fehérjét (NL43) (RE007-es törzs) illetve az egyik mutáns Vpr fehérjét (F34I) kódoló gén (RE076-os törzs) van integrálva. Ez a konstrukció lehetővé tette a Vpr fehérje oxidatív stresszt okozó hatásainak vizsgálatát eukarióta sejtekre.

A külső és belső eredetű, különböző oxidatív stresszhatások *Schizosaccharomyces pombe* sejteire gyakorolt hatásainak vizsgálata során a következő célokat tűztük ki:

1.) Randomspóra analízissel megvizsgálni a *chr1-66T* és a *chr2-046T*, valamint a *chr1-66T* és a *chr1-14T* törzsek keresztezéséből származó spóráklónokat és megállapítani azt, hogy milyen arányban lettek az utódok króm-toleránsak, illetve króm-szenzitívek. Erre azért volt szükség, hogy a későbbi kutatásokhoz izoláljunk egy génben sérült, króm-szenzitív, illetve króm-toleráns mutánsokat.

2.) Megvizsgálni, hogy a mutáns Vpr fehérjét expresszáló RE0076-os törzsben milyen mértékben nő a ROS, valamint hogyan szabályozza a sejt az antioxidáns védelmi rendszert a Vpr fehérje jelenlétének következtében.

Alkalmazott módszerek

Kísérleteink során a $89chr^+(89chr^+ura4-D18 h^+)$, $90chr^+(90chr^+ura4-D18 h^-)$, $chr1-14T (chr1-14Tleu1-32 h^-)$, $chr2-046T (chr2-046Tleu1-32 h^-)$, $9chr^+ (9chr^+ leu1-32 h^-)$, $chr1-661T (chr1-661Tlys1-31 h^+)$, $chr-63T (chr-63Tlys1-131 h^-)$, illetve a SP223 ($ade6-216 leu1-32 ura4-294 h^-$), RE007 ($leu1-32 ura4-294::vpr(NL4-3) ura4^+::ade6-216 h^-$) és a RE076 ($leu1-32 ura4-249 ::vpr(F34I)::ura4^+ ade6-216 h^-$) törzseket használtuk. A *S. pombe* törzseket az auxotrófiának megfelelően, aminosavakkal kiegészített YEA táptalajon, illetve YEL tápoldatban tenyésztettük. A Vpr fehérje expresszáására képes törzseket MM táptalajon, illetve tápoldatban tenyésztettük kiegészítve az auxotrófiának megfelelően aminosavakkal, illetve tiaminnal (amely a promóter régiót szabályozza).

A sejtek szaporodási ütemének meghatározása Bürker-kamrás számolással történt.

A minimális gátló koncentrációt (MMG) feltöltéssel határoztuk meg.

A randomspóra analízisnél a protoplasztálást lízis enzimmel végeztük, majd a keresztezés 0,6 M-os KCl oldattal ozmotikusan stabilizált MEA (spóráztató) táptalajon történt. A vegetatív sejtek előlése után a spórákat YEA táptalajon szélesztettük.

A spóráklónok tesztelése króm-toleranciára szintén feltöltéssel történt, meghatározott króm koncentrációjú YEA táptalajon. A kiértékelést hét és tíz nap elteltével végeztük.

Az élősejtszám meghatározás propidium jodid (PI) festéssel történt. A mérést Perkin-Elmer LS50B típusú fluoriméterrel végeztük. A propidium jodidot PBS oldatba vettük fel.

A szeptációs index meghatározásánál a sejteket calcoflourral festettük meg, melynek hatására a szeptumok láthatóvá váltak. A mikroszkóp alatt mérésenként 500 sejtet számoltunk meg, és megnéztük, hogy ebből mennyi sejtnél van válaszfal.

Sejtfeltáráshoz a megfelelő tenyésztési idejű mintákat 8 ml foszfát pufferben vettük fel, és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztottuk. Ezután X-press-t használtunk (X-PRESS 25 ml, AB BIOX, Dybecksgatan 10, S-412 70 Göteborg SWEDEN). A mérés napján a mintákat fenil-metil szulfonil fluorid (PMFS) oldatban vettük fel. A jégen tartott mintákat hűtött centrifugában 10 000 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntöttük és a továbbiakban használtuk az enzimaktivitások mérésére.

ROS meghatározása:

Az intracelluláris peroxid meghatározásához dihidrorodamin 123 (DHR123)-at használtunk, és a méréseket BD áramlási citométerrel végeztük el. A festék végkoncentrációja $10\text{ }\mu\text{M}$ volt minden esetben. Közvetlenül a mérés előtt a mintákat Na-Hepes pufferben hússzorosára hígítottuk. A méréseket a 0. 20. 40. és 60. percben végeztük el. Az extinció hullámhossz λ_{ex}

= 488 nm, az emissziós $\lambda_{em} = 525$ nm volt. A műszer 10 000 sejtet mért le és abból számolt egy átlagot és szórást (FACS Calibur). Szuperoxid gyök koncentráció mérése esetén gyökfogó festéknek hidroetidiumot (HE9 használtunk 10 μ M koncentrációban. A gerjesztési hullámhossz $\lambda_{ex} = 488$ nm, az emissziós hullámhossz $\lambda_{em} = 610$ nm volt. Kalibrálósor etidium bromidból készítettünk, ügyeltünk arra, hogy a kalibrálósor pH-ja és a minta pH-ja megegyezzen. A kapott értéket fehérjetartalomra vonatkoztattuk.

A hidroxil gyök intracelluláris koncentrációjának és a Cr(VI) redukálóképesség meghatározásához EPR spektroszkópiát használtunk. Gyökfogónak N-*tert*-butil- α -phenil nitron (PBN) törzsoldatot használtunk, a méréseket ESP 300E spektrométerrel (Bruker Biospin) végeztük, a mért termék a PBN-OH volt.

Az antioxidáns enzimaktivitások és a glutation meghatározása:

A GR, GST, GPx, G6PD, CAT, Cu/Zn-SOD és Mn-SOD specifikus aktivitásának és a GSH és GSSG intracelluláris koncentrációjának meghatározásához spektrofotometriás módszereket alkalmaztunk.

A középértékeket és azok szórásait (SD) minimum négy független mérés adataiból számoltuk. A szignifikancia vizsgálatokhoz az adatok eloszlásától függően a Student-féle t-tesztet használtuk. Az eltéréseket $P \leq 5\%$ valószínűségi szinten tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények és következtetések

A króm tolerancia és szenzitivitás öröklődésének a vizsgálata

Előzetesen a vad típusú *S. pombe* törzsből NTG (N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin) és UV sugárkezelés után izoláltak króm érzékeny és króm toleráns mutánsokat (Czakó és mtsi., 1999). Ezután a kiválasztott 11 króm szenzitív vagy króm toleráns törzseket kereszteztük az *ura4D18* markerrel rendelkező *89chr⁺h⁺* és a *90chr⁺h⁻* törzsekkel a megfelelő párosodási típusok figyelembevételével. A vizsgálandó mutánsok közül csak a *chr1-661T*, a *chr2-046T* és a *chr1-14T* törzsek keresztezése a *89chr⁺h⁺* és a *90 chr⁺h⁻* törzsekkel adott zigotikus aszkuszkokat, melyeket tovább vizsgáltunk tetrádanalízissel és randomspóra analízissel. A *chr1-661T* (lys1-131 h⁺, MIC_{Cr(VI)}:275 μ M) x *chr2-046T* (leu1-32 h⁻, MIC_{Cr(VI)}:300 μ M) törzseket kereszteztük. Protoplaszt fúzióval történt az aszkuszk előállítása és azután a randomspóra analízis. 104 spórát teszteltünk. Ebből 44 krómtoleránsnak (MIC_{Cr(VI)}:275 μ M) mutatkozott, 60 pedig króm szenzitív lett. Ez az eredmény azt mutatja, hogy az egygénés mutációk a két törzsben nem allélikusak, azaz két

különböző génben történtek. A *chr1-661T* ($lys1-131 h^+$, $MIC_{Cr(VI)}:275\mu M$) x *chr1-14T* ($leu1-32 h^-$ $MIC_{Cr(VI)}:275\mu M$) törzsek keresztezésénél 84 spóráklónt izoláltunk. Ezek közül 73 klón a szülőkkal azonos krómtoleranciát mutatott ($MIC_{Cr(VI)}:275\mu M$). 11 spóráklón pedig bár toleránsnak bizonyult, de a tolerancia szintje kis mértékben csökkent ($MIC_{Cr(VI)}:250\mu M$). Az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a két törzsben a krómtoleranciát eredményező mutáció azonos génben következett be. A *chr1-661T* törzsről mind a tetrad és mind a randomspóra analízis együttesen bebizonyította, hogy stabil, egy génes Cr(VI) toleranciával rendelkezik. Később ennél a *chr1-66T* toleráns mutánsnál kimutatták, hogy a Cr(VI) toleráns fenotípus oxidatív stressz érzékenységgel párosul. Ez lehetővé tette a toleráns és a szülői törzsek egy sejt szinten történő elválasztását, valamint a későbbi transzformációs kísérleteknél a direkt szelekciós módszer kidolgozását.

Elvégeztem a *9chr⁺* és a *chr2-04T* törzsek, valamint a *89chr⁺* és *90chr⁺ ura4D18* auxotrófiával rendelkező törzsek keresztrezisztencia vizsgálatát króm, kadmium, réz, cink és nikkel tartalmú fémes vegyületekre. Megállapítottuk, hogy a vizsgált mutánsok keresztérzékenysége széles skálán mozgott. Az, hogy egy mutáns törzs krómra toleráns, nem jelent más fémekkel szembeni rezisztenciát. A különböző króm érzékenyséű mutánsok szaporodási üteme is megváltozott. Ennek oka, hogy a növekedési görbe változása függ az antioxidáns védelmi rendszertől is, amely működését szintén befolyásolja a króm-érzékenység.

A Vpr fehérje hatásainak vizsgálata

Megvizsgáltam a *S. pombe* RE076-os mutáns F34I Vpr fehérjét expresszáló törzs szaporodását tiamin jelenlétében (gén represszió) és tiamin hiányában (gén expresszió), valamint a szülői Sp223-as törzset is. Megállapítottam, hogy 30 °C-on 20 óra elteltével nincs különbség a szaporodás menetében, de az F34Ivpr fehérjét expresszáló törzsnél a sejtek szaporodása leáll a 20. órában, majd 26 óránál indul újra a tiamin mentes tápoldatban. Ennek oka a két időpont közötti, Vpr fehérje által okozott, a szaporodás G2 fázisában blokkolt sejtciklus. A 20. óra után különbség mutatkozik az Sp223-as és az RE076-os vpr represszált törzsek sejtszámában, amely az RE076-os törzs esetében 20 %-kal kevesebb, mint a szülői törzsnél. A szaporodási fázisban kialakult G2/M sejtciklus blokkot szeptációs index vizsgálatával is alátámasztottuk. Az RE076-os törzsnél 20-26 óra közötti időpontban nem változott a szeptummal rendelkező sejtek száma, míg az SP223-as törzsnél és az RE076-os vpr represszált törzsnél magas számban voltak szeptumok a 20. óra után is. Az SP223-as törzsnél az összes sejt közel 25%-a, az RE076-os vpr represszált törzs 17%-a rendelkezett szeptumokkal. A sejtek morfológiai vizsgálatát elvégezve azt tapasztaltuk, hogy a 14 órás

tenyészeteknél nem figyelhető meg alaki változás, addig a 35 órás tenyészeteknél az RE076-os törzs esetében láthatóak az ú.n. „cdc” fenotípussal rendelkező sejtek. Az SP223-as és az RE076-os vpr represszált törzs közötti eltérések oka az *nmt1* promóter régió 97-98%-os hatékonysága. A további kísérleteknél a kontrol az SP223-as szülői törzs lett.

Korábbi irodalmi adatok állítása szerint a Vpr fehérjének 19 óra elteltével mutatkozik meg a sejtekre gyakorolt morfológiai hatása. Az előző eredmények alapján kiválasztottunk két időpontot: 14 órás tenyészet, ahol a Vpr morfológiai hatása még nem nyilvánul meg, illetve a 35 órás tenyészetet, ahol a Vpr fehérje által okozott G2/M blokk feloldódott és a Vpr fehérje hatása is meg nyilvánul. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a mutáns Vpr fehérje expressziójának hatására bekövetkeznek-e fiziológiai változások a sejtben.

Szignifikánsan alacsonyabb GSH koncentrációt állapítottunk meg a 14 és a 35 órás tenyészeteknél is az RE076-os törzsnél az SP223-as törzshöz képest. A mért GSSG koncentrációja a 14 órás Vpr expresszált tenyészetnél csökken, de a 35 órásnál szignifikánsan nő a szülői törzshöz képest. A lecsökkent GSH alapján következtethetünk, hogy a ROS mennyisége megnövekedett. Az $O_2^{\cdot -}$ koncentrációja az F34Ivpr expresszált törzsnél szignifikánsan alacsonyabb volt a 14 órás tenyészetben a szülői törzshöz viszonyítva, de megnövekedett a 35 órás tenyészetnél. Ennek ellenére az összes SOD aktivitás mindkét időpontban alacsonyabb volt az RE076-os törzsnél. A peroxidok mennyisége a 14 órás, mind pedig a 35 órás tenyészetek esetében szignifikánsan emelkedett a szülői Sp223 törzshöz viszonyítva a mutáns RE076-os törzsnél. A peroxid intenzitása jóval alacsonyabb a 14 órás tenyészetnél, mint a 35 órásnál, ez az érték a tenyészetek korával van összefüggésben. A megnövekedett peroxidok mennyisége alacsony GSH szinttel, és sejtszám csökkenéssel jár együtt. A szuperoxid-gyök és a H_2O_2 részt vesz a Cr(VI) intermedierek reoxidációjában melynek során, $\cdot OH$ gyök képződik, ami EPR-rel mérhető. Méréseink alapján nem volt lényeges különbség a mért Cr(V) koncentrációban a szülői SP223-as és a RE076-os törzs között egyik időpontban sem. Megfigyeltük, hogy miután a vizsgált mintákhoz 2mM-os $K_2Cr_2O_7$ oldatot és 2 mM-os NADPH oldatot adtunk a 14 órás tenyészeteknél szignifikánsan megnőtt a Cr(V) képződése. A Cr(V) szintje közel négyszeresére emelkedett a szülői törzsben az RE076-os törzshöz viszonyítva. A 35 órás kultúrákban hasonló jelenséget figyeltük meg, bár az emelkedés mértéke alacsonyabb volt. Az RE076-os törzsnél szignifikánsan alacsonyabb hidroxil-gyök ($\cdot OH$) koncentrációt mértünk Cr(VI), vagy Cr(V) +NADPH hozzáadása után mind a 14 órás, mind pedig a 35 órás tenyészetnél annak ellenére, hogy mindkét időpontban magas volt a H_2O_2 koncentrációja, illetve a 35 órás tenyészetnél magas

szuperoxid gyököt ($O_2^{\bullet -}$) mértünk. Ezen adatokból következtethetünk az RE076-os törzs sejtjeinek oxidált állapotára.

Az antioxidáns enzimek specifikus aktivitását mérve a 14 órás tenyészetek esetében az RE076-os törzsnél a szülői SP223-as törzshöz képest szignifikánsan alacsonyabb az össz SOD értéke. A CAT mennyisége szintén alacsonyabb az RE076-os törzsnél. A GR-nál és a G6PD-nél szintén alacsonyabb aktivitást mértünk az RE076-os törzsnél az SP223-as szülői törzshöz képest. Nem változott viszont a GPx és a GST aktivitás mértéke. A 35 órás tenyészeteknél az RE076-os törzsnél csökkent a GST, az össz SOD, a CAT valamint a G6PD aktivitásának mértéke. Nem változott a GR mennyisége. A GPx szintje viszont emelkedett. Az általunk kapott eredményekre hivatkozva kijelenthetjük, hogy a megnövekedett ROS szintje kapcsolatban áll a ROS által szabályozott redox-szenzitív transzkripcióval és a sejtek túlélése is függ a ROS mértékétől mind a humán, mind pedig az élesztő sejtekben

Összefoglalás

1. Tanszékünk kutatási programja a krómvegyületek hatásmechanizmusának vizsgálata *S. pombe* sejteken, és ehhez kapcsolódóan a krómtoleranciáért és krómszenzitivitásért felelős gének vizsgálata. Az indukált mutációval előállított 11 mutáns törzs közül kellett kiválasztani azokat a krómtoleráns mutánsokat, amelyek biztosan egy génben sérültek. Nem mindegyik keresztezendő törzs volt képes zigotikus aszkuszt képezni. Ezért a célkitűzésünk volt a terádanalízises vizsgálatok mellett randomspóra analízissel megvizsgálni a *chr1-661T* és a *chr2-046T*, valamint a *chr1-661T* és a *chr1-14T* törzsek keresztezéséből származó spóráklónokat és megállapítani azt, hogy milyen arányban lettek az utódok króm-toleránsak, illetve króm-szenzitívek. Erre azért volt szükség, hogy a későbbi kutatásokhoz izoláljunk egy génben sérült, króm-szenzitív, illetve króm-toleráns mutánsokat.

Elvégeztem a *chr1-661T* és a *chr2-046T*, valamint a *chr1-661T* és a *chr1-14T* törzsek keresztezését, izoláltam a spóráklónokat, és elvégeztem a krómtolerancia tesztet mindegyik izolált spóráklónon. Megállapítottam, hogy a *chr1-661T* és a *chr2-046T* törzsek keresztezéséből izolált 104 spóráklón közül 60 db lett króm szenzitív és 44 darab pedig króm toleráns. Ezen eredmények azt bizonyították, hogy a a krómtoleranciáért felelős mutációk két különböző génben történtek. A *chr1-661T* és a *chr1-146T* törzsek keresztezésénél izolált 84 db spóráklón közül 73 mutatott a krómmal szemben toleranciát, azaz a vizsgált mutánsoknál ugyanabban a génben történt mutáció.

Meghatároztam a *9chr⁺*, *chr2-04T* törzsek, valamint a *89chr⁺* és *90chr⁺ ura4D18* auxotrófiával rendelkező törzsek keresztrezitencia vizsgálatát kadmiumra, vasra, cinkre, vanádiumra nikkelle, rézre és szelénre nézve, ahol megállapítottuk, hogy ha krómmal szemben kialakul a tolerancia, az nem jelent más fémekkel szembeni toleranciát is.

Ezen munkák eredménye vezetett a későbbi kísérletekhez kiválasztott Koósz és mtsi.,(2008) által pUR18N vektorral transzformált kísérletekhez, és a későbbi munkákhoz, melyek rámutattak arra, hogy a Cr(VI) redukciójában a GR játszik meghatározó szerepet.

2. A korábbi kutatási eredmények megállapították, hogy a vírusfehérjék belső stresszorként működhetnek a sejtben. Mi a HIV-1 Vpr fehérje hatását vizsgáltuk olyan *S. pombe* sejteken, mely adott körülmény között (promóter régióval szabályozva) expresszálja a fehérjét. Ehhez egy olyan típusú mutáns Vpr fehérjét vizsgáltunk, mely a vad típustól csak 1 aminosavban tér el, de a G2/M sejtosztódási blokk után nem öli meg a sejteket, hanem a szaporodási ciklus újraindul. Ez a tulajdonsága lehetővé tette számunkra, hogy idősebb tenyészetnél is meg tudjuk vizsgálni az oxidoredukciós rendszer állapotát. Célunk volt megvizsgálni, hogy a mutáns Vpr fehérjét expresszáló sejtben milyen mértékben nő a ROS, valamint hogyan szabályozza a sejt az antioxidáns védelmi rendszert a Vpr fehérje jelenlétének következtében.

A mutáns F34Ivpr-t expresszáló törzset (RE076) összehasonlítva a szülő törzsszel, (SP223) egy korai log (14 órás tenyészet) és egy késő log (35 órás tenyészet) szaporodási fázisban, **először bizonyítottuk be**, hogy az F34IVpr fehérje oxidatív stresszt okoz a sejtekben. Ugyan is ez a ROS képződését generálja, megemelve a szuperoxid és peroxid koncentrációt, amely csökkent intracelluláris GSH és hidroxil gyök koncentrációt eredményezett. Ezen kívül a totál SOD, a CAT, és a GSH függő GPx, GR, GST és G6PD antioxidáns enzimek szignifikánsan csökkent specifikus aktivitását is eredményezte. Ezek az eredmények egyértelműen mutatják, hogy az oxidatív stresszre adott válasz atipusos, amely azzal magyarázható, hogy a Vpr fehérje párhuzamosan az oxidatív stresszt indukáló folyamatokkal más, a sejt számára lényeges folyamatokat is módosít és ezért a sejtek nem tudják az oxidatív stressz okozta változásokat szabályozni, hogy visszaállítsák a redox homeosztázisukat. Eredményeink és megfigyeléseink rámutatnak a Vpr protein szerepére a HIV-1 fertőzés során, melyek a jövőbeni Vpr által okozott oxidatív stressz vizsgálatok alapjait szolgálhatnak.

Az értekezés alapjául szolgáló angol nyelvű tudományos folyóiratokban megjelent közlemények:

Stromájer-Rácz Tímea; Gazdag Zoltán; Belágyi József; Vágvölgyi Csaba; Zhao Richard Y; Pesti Miklós (2010) Oxidative stress induced by HIV-1 F34IVpr in *Schizosaccharomyces pombe* is one of its multiple functions. *Experimental and molecular pathology* 88(1):38-44. IF:2,986

K. Czakó-Vér, Z. Koósz, J. Antal, **T. Rácz**, M. Sipiczki, M. Pesti (2004) Characterization of Chromate-Sensitive and Tolerant Mutants of *Schizosaccharomyces pombe*., *FoliaMicrobiologica* 49: 31-36. IF:1,034

Előadások:

Pesti Miklós, Gazdag Zoltán Takács Krisztina, Czakó-Vér Klára, Koósz Zsuzsa, Antal Judit, **Rácz Tímea**: A krómvegyületek hatásmechanizmusa élesztősejteken. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. Évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium

Rácz Tímea: Néhány króm-érzékeny *Schizosaccharomyces pombe* mutáns klasszikus genetikai jellemzése. 2003. XXVI. Országos Tudományos Diákkori Konferencia (OTDK), mikrobiológiai szekció, Szegedi Tudományegyetem

Konferencia poszter kivonatok:

Tímea Stromájer-Rácz, Zoltán Gazdag, Tímea Dergez, Linda Sárga, Pal Gabor Stromájer, Csaba Fekete and Miklós Pesti: Effect of HIV-1 viral protein R (Vpr) on cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. [XVth International Congress of the Hungarian Society for Microbiology](#), 2007. 07. 18-20, Budapest, Hungary

Tímea Stromájer-Rácz, Zoltán Gazdag, Zsigmond Benkő, Judit Antal and Miklós Pesti: Oxidative stress induced by a mutant viral protein R (Vpr) of HIV-1 expressed in *Schizosaccharomyces pombe*. 2006.05.10-12. Smolenice, Slovakia,

M. Pesti, Z. Gazdag, G. Papp, J. Antal, **T. Stromájer-Rácz**, Zs. Koósz, K. Takács, I. Pócsi, J. Belágyi, P. Raspor: Mechanism of action of chromium compounds of *Schizosaccharomyces pombe*. European Fission Yeast Meeting, 2006., Cambridge, England

Stromájer-Rácz, T., Pesti, M.: Stress induction of human immunodeficiency virus type 1 protein R (Vpr) on fission yeast. 1 st Central European Forum for Microbiology (CEFORM) Keszthely, Hungary October 26-28, 2005.

Gazdag, Z., Farkas, N., Belágyi, J., Papp, G., **Rácz, T.**, Takács, K. and Pesti, M.: Altered cadmium sensitivity of respiratory-deficient *Schizosaccharomyces pombe* mutant.,

International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, október 9-11, 2003.

Czakó-Vér, K., Antal, J., **Racz, T.**, Pesti, M., Hereditological Analysis of Chromium-Tolerant Mutants of *S. Pombe*. XXI. Annual Conference on Yeasts, Smolenice, Slovakia, 2001.

Az értekezésben nem szereplő angol nyelvű tudományos folyóiratokban megjelent közlemények:

Jeney, Z., **Racz, T.**, Thompson K., Poobalan, S., Ardo, L., Adams A. Jeney, G. (2009) Differences in the antibody response and survival of genetically different varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) vaccinated with a commercial *Aeromonas salmonicida*/A. *hydrophila* vaccine and challenged with *A. hydrophila*. Fish Physiol Biochem. 35(4): 677-682. DOI 10.1007/s10695-009-9329-3 IF: 1,232

Guojun, Y., Jeney, G., **Racz T.**, Xu P., Jun X. and Jeney Z. (2006) Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 253:39-47. IF: 2,084

Előadások:

Jeney Galina, **Rácz Tímea**, Ardó László, Jeney Zsigmond:
Genetikailag különböző ponty (*Cyprinus carpio* L.) variánsok antitest válasza *Aeromonas salmonicida*/A. *hydrophila* elleni vakcinálás hatására és megmaradási arányuk A. *hydrophila* fertőzés után. 2005. május 4-5. XXIX. Halászati Tudományos Tanácskozás

Jeney Galina, **Rácz Tímea**, Bakos János, Jeney Zsigmond: A ponty (*Cyprinus carpio* L.) genetikailag különböző változatainak nem specifikus immunválasza *Aeromonas salmonicida*/A. *hydrophila* vakcinálás hatására. 2004. május 12-13. :XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás

Jeney Zsigmond¹, Kormos Balázs¹, Bakos János¹, Lehoczky István^{1,2}, **Rácz Tímea**¹, Magyary István², Bercsényi Miklós³, Urbányi Béla⁴, Jeney Galina¹: Eltérő genetikai háttérű pontyok stressz toleranciája, a Resicarp Projekt előzetes eredményei. 2004. május 12-13. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás

Konferencia poszter kivonatok:

Jeney, G., Yin, G., **Racz, T.**, Xu, P., Jeney, Z. 2005. Modulation of native immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*, by Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*). 6th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 25-28 October 2005, Colombo, Sri Lanka. Abstract. p. 176.

Jeney, G., **Racz, T.**, Jeney, Z., Thompson, K.D., Poobalan, S., Adams, A. 2005. Antibody response after immunization with *Aeromonas salmonicida*/A. *hydrophila* vaccine and survival rates after challenge with *A. hydrophila* of genetically different varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.). EAAP 12th International Conference. 11-16 September 2005, Copenhagen, Denmark. Abstractp. 80.

Jeney, Z., B. Kormos, **Timea RÁCZ**, J. Bakos, M. Bercsényi, I. Lehoczky and Galina Jeney, Stress resistance of genetically different carp (*Cyprinus carpio* L.) landraces and hybrids. Biotechnologies for Quality. Extended abstracts of the International Conference „Aquaculture Europe 2004”, Barcelona, Spain, October 20-23, 2004. Abstractp. 444-445.

Jeney, G., **RÁCZ, T.**, Jeney, Z. 2004. Non-specific immune response of genetically different varieties of common carp (*Cyprinus carpio*) to vaccination against *Aeromonas salmonicida*/*Aeromonas hydrophila*. 6th International Symposium on Fish Immunology. 24-29 May, Turku, Finland. Abstract p. 51.

Racz, T., Jeney, G., Jeney, Z. 2004. In vitro immunological assays with *Aeromonas salmonicida*/*A. hydrophila* vaccine in different common carp (*Cyprinus carpio*) varieties. 6th International Symposium on Fish Immunology. 24-29 May, Turku, Finland. Abstract p. 61.

Összesített Impakt Faktor: 7,336